

Expressziós vektor és eljárás előállítására

A2

K I V O N A T

A találmány expressziós vektorra és annak előállítására vonatkozik. A találmány szerinti expressziós vektor az alábbi elemeket tartalmazza:

- a pBR322 vagy pKK223-3 vektornak legalább azokat a komponenseit, amelyek saját replikációjához szükségesek,
- olyan expressziós tartományt, amely a leolvasás irányában egymást követően egy első promótert, represszorra specifikus kötőhelyet, prokarióta riboszómakötőhelynek megfelelő szekvenciát, annexin V-öt kódoló gént magában foglaló klónozási helyet és legalább egy transzkripció terminátort tartalmaz,
- legalább egy antibiotikum rezisztenciát közvetítő gént egy második promóterrel.



2000.08.01

AZ

Expressziós vektor és eljárás előállítására

A találmány tárgya expressziós vektor, a találmány szerinti vektort tartalmazó *E. coli* sejt és az expressziós vektor előállítására alkalmas eljárás.

A találmány szerinti megoldás előnyösen alkalmazható mind az ipari, mind pedig a kutatási jellegű genetikai manipulációs eljárásokban.

Általánosan ismert, hogy eukarióta gének plazmid, ill. vektor segítségével baktériumokba juttathatók és ott expressziós vektorként expresszálhatók. A vektorok szokásos elemei: replikációs origó, antibiotikum elleni rezisztenciát közvetítő gén, a Lac-represszort kódoló lac-I-gén, a lac-operátor ellenőrzése alatt álló promóter és optimális kötőhely riboszómák számára. Ehhez általában rövid nyitott leolvasási fázis kapcsolódik, amely több lehetőséget nyújtó klónozási helyet tartalmaz egy cDNS-szakasz helyes leolvasási fázisba történő beépítéséhez. Az ilyen expressziós vektor a baktériumban inaktív, ha a Lac-represszor a beépített cDNS átírását megakadályozza. Ha az expressziós vektort olyan baktériumba juttatják, amelyben a lac-I-gén más módon expresszálódik (például mert más vektoron már megvan), nincs szükség arra, hogy az expressziós vektorban is meglegyen. Az IPTG induktor adagolásával a transzkripció egyszerű módon szabaddá tehető. Ilyenkor a baktérium gyak-

ran, de nem mindig a cDNS kódolta proteint termeli. Gyakran a protein nem oldódik és már a baktériumban válik ki csapadékként zárvány formájában. A fent említett elemeket tartalmazó vektorok közül nem mindegyik alkalmas egy adott protein expresszálasához.

A találmány feladata olyan vektor - és előállítására alkalmas eljárás - kifejlesztése volt, amely az annexin V expressziójához jól alkalmazható. A találmány további feladata olyan *E. coli* sejt megteremtése volt, melynek segítségével annexin V előállítható.

A fenti feladatot az 1., 19. és 21. igénypontok ismerveivel oldottuk meg A 2-18., 20. , valamint 22-40. igénypontok ismervei a találmány előnyös kiviteli alakjaira vonatkoznak.

A találmány értelmében olyan expressziós vektort alkalmazunk, amely az alábbi elemeket tartalmazza:

- a pBR322 vagy pKK223-3 vektornak legalább azon komponenseit, amelyek saját replikációjához szükségesek,
- olyan expressziós tartományt, amely a leolvasás irányában egymást követően egy első promótert, represszorra specifikus kötőhelyet, prokarióta riboszómakötőhelynek megfelelő szekvenciát, annexin V-öt kódoló gént magában foglaló klónozási helyet és legalább egy transzkripciós terminátort tartalmaz,
- legalább egy antibiotikum rezisztenciát közvetítő gént egy második promóterrel.

A pBR322 vektor a K12 SK1592 sz. *E. coli* törzsből származik, amely a DSMZ-től DSM 3879 szám alatt szerezhető



be. A pKK223-3 vektor is ismert (J. Brosius és A. Holy, (1984) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81, 6929-6933. old.) és például az Amersham Pharmacia Biotech freiburgi cégtől szerezhető be. A komponenseken itt olyan nukleotidszekvenciákat értünk, amelyek a pBR322 vagy pKK223-3 vektorban jelen lévő funkcionális egységeket kódolják. Ezek a funkcionális egységek lehetnek gének, például a rop-gén, vagy olyan nukleotidszekvenciák, amelyeknek egyéb - például a vektor replikálása során szükséges - funkciói vannak. A találmány szerinti expressziós vektor a pBR322 vagy pKK223-3 vektor összes komponensét, különösen a vektor teljes nukleotidszekvenciáját tartalmazhatja. A vektor egyes komponenseit azonban hiányozhatnak is, mégpedig azok, amelyek a vektor replikációjához nem szükségesek. A második promótert tartalmazó, antibiotikum elleni rezisztenciát közvetítő gén egy, a pBR322 vagy pKK223-3 vektorban eredetileg jelen lévő gén lehet a hozzátartozó promóterrel együtt, de származhat más forrásból is.

A represszorra specifikus kötőhely lehetővé teszi, hogy az annexin V-öt kódoló gén expresszióját indukáljuk. A prokarióta riboszómakötőhelynek megfelelő szekvencia olyan szekvencia, amelynek átírásával prokarióta riboszómakötőhelyként (Shine-Dalgarno-szekvencia) működő mRNS-szekvencia keletkezik. A prokarióta riboszómakötőhelyre a leolvasás beindulásához van szükség. A klónozási hely lehet egyfunkciós, lehet többfunkciós (több különböző hasító-, így beillesztőhellyel is rendelkező) és lehet olyan is, amelyet az annexin V-öt kódoló gén beillesztése után restrikciós



enzimek már nem emészthetnek. Az egyszerű klónozási hellyel szemben a többfunkciós klónozási helynek több hasítóhelye van restriktációs enzimek számára, így különböző DNS szakaszok építhetők be. A klónozási hely az leolvasási fázisban egy, annexin V-öt kódoló gént tartalmaz. A gén nukleotidszekvenciája eltérhet a természetes nukleotidszekvenciától, de csak oly mértékben, hogy a protein szekvenciája nem változik, ill. változása a protein funkcióját nem érinti. A protein funkciója lehet az annexin V több funkciója között akár egyetlenegy is. Ilyen funkciók például a foszfatidil-szerin megkötésének képessége vagy a véralvadás gátlása. Az expressziós tartomány - az annexin V-öt kódoló gén nélkül - különösen a pKK223-3 vektor komponenseit tartalmazó expressziós vektor esetén legalább részben a pKK223-3 vektor 4146 és 4172. nukleotid közötti expressziós tartományából származhat.

Meglepő módon bebizonyosodott, hogy a találmány szerinti expressziós vektor annexin V expressziójához különösen alkalmas. Az annexin V-öt kódoló gén előnyösen csirkéből származik. Ez a gén különösen alkalmas az expressziós vektor segítségével végzett expresszióhoz. A csirkéből származó, 966 bázispár méretű annexin-V-génnel együtt az expressziós vektor mintegy 4000 bázispár méretű lehet, így jól kezelhető. Annak érdekében, hogy *E. coli* sejtekben az annexin V különösen hatékonyan expresszáldjék, az annexin V-öt kódoló génben egyes kódonokat olyanokra cserélhetünk, amelyek olvasása *E. coli* sejtekben preferált. Tekintettel arra, hogy az annexin-V-gén természetes stop-kódonját az *E.*



coli sejt nem mindig ismeri fel, a keletkezett protein járulékosan nemkívánatos aminosavakat tartalmazhat. Ezért az annexin V-öt kódoló gén szekvenciájának 3'-végén előnyösen legalább egy járulékos stop-kódon van a gén leolvasási fázisában. Különösen előnyös, ha két járulékos stop-kódon van, ennek hatására az expresszált protein pontosan a megfelelő helyen ér véget.

Az első promóter előnyösen *tac*-promóter. A represszor lehet *Lac*-represszor. A *tac*-promóter a H. A. De Boer és mtsai (Proc. Natl. Acad. Sci. USA 80 (1984), 21-25. old.) által publikált *tac*-promóternek felel meg. Hibrid promóterről van szó, amely a *Lac*-represszorra specifikus kötőhellyel kombinálva lehetővé teszi az annexin-V-gén - például allo-laktózzal vagy izopropil- β -D-tiogalaktóziddal (IPTG) indukálható - expresszióját. Olyan *E. coli* törzsekben, amelyek *Lac*-represszorból magas szintet termelnek, a transzkripció gátolt. Az ilyen törzseket *lac* I^q-törzsnek nevezik. A transzkripciós terminátor lehet *rrnB* T1 vagy *rrnB* T2 transzkripciós terminátor. Az is lehetséges, hogy mind *rrnB* T1, mind *rrnB* T2 transzkripciós terminátorként szerepel. Az *rrnB* T1 és T2 transzkripciós terminátorok az *E. coli* *rrnB* operonjából származnak.

Előnyös, ha az expressziós vektor a pBR322 komponensei közül az ampicillin-rezisztenciagént és/vagy a tetraciklin-rezisztenciagént, a pKK223-3 vektor komponensei közül az ampicillin-rezisztenciagént nem vagy csak részben tartalmazza. Ezzel az expressziós vektor kisebb. Az expressziós vektor antibiotikum-rezisztenciagénje előnyösen



kanamicin-rezisztenciagén, különösen a pACYC177 vektor vagy az *E. coli*-ból származó Tn903 transzpozon kanamicin-rezisztenciagénje. A Tn903 transzpozon kanamicin-rezisztenciagénje a pUC4K plazmid Bam HI restrikciós nukleázzal végzett emésztése útján fragmentsként kapható. A pUC4K plazmid például az Amersham Pharmacia Biotech freiburgi cégtől szerezhető be. A pACYC177 vektor a PC2166 sz. *E. coli* törzsből származik, amely a braunschweigi Német Mikroorganizmus- és Sejtkultúra Gyűjteményből DSM 5587 szám alatt szerezhető be.

A második promóter előnyösen a pACYC177 vektorból származó pK promóter. A kanamicin-rezisztenciagén a második promóterrel együtt a pBR322 vektorból származó Eco RI és Sty I restrikciós hasítóhelyeken vagy a pKK223-3 vektorból származó Eco RI restrikciós hasítóhelyen illeszthető be az expressziós vektorba. A kanamicin-rezisztenciagén a második pK promóterrel együtt előnyösen a pACYC177 vektor 1816. és 2771. nukleotid közötti szekvenciatartományában helyezkedik el az expressziós vektorban.

Az expressziós tartomány a pBR322 vektorból származó Ban I és Eco RI restrikciós hasítóhelyeknél illeszthető be az expressziós vektorba. Az annexin V-öt kódoló gén nélkül az expressziós tartomány előnyösen a mellékelt szekvencia-lista szerinti 1. azonosítószámú szekvenciával rendelkezik

Az egyik kiviteli példa esetén az expressziós vektorban II. osztálybeli, az ATG nukleotidsorral rendelkező felismerő szekvenciát tartalmazó restrikciós endonukleáz számára a klónozási helyen kívül eső hasítóhely nincs. A II.

osztálybeli restriktációs endonukleázok felismernek specifikus nukleotidszekvenciákat és specifikusan ezekben a szekvenciákban vagy azok közelében vágnak. Az ATG nukleotidsorral rendelkező felismerő szekvenciát tartalmazó II. osztálybeli endonukleáz egyszerű módon teszi lehetővé az expresszálni kívánt gén ATG startkódonjának klónozását. Az mRNS hatékony olvasását biztosító távolság (mRNS és riboszómakötőhely között) prokarióták esetén 4-8 nukleotid a riboszómakötőhely utolsó nukleotidja és a startkódon A-ja között. Ha a klónozási helyen kívül az említett restriktációs endonukleáz számára nincs hasítóhely, ezt a hasítóhelyet a klónozási helyen használhatjuk fel arra, hogy egyszerű módon az expresszálni kívánt annexin V-gén startkódonját optimális távolságban klónozzuk a riboszómakötőhelytől. Előnyösen az Nde I és Nco I restriktációs endonukleáz alkalmazzuk. A restriktációs hely eltávolítása irányított mutagenézissel történhet. Az Nde I restriktációs endonukleáz egyik eltávolítandó hasítóhelye a pBR322 vektorból származhat. Az expressziós vektor (az annexin V-öt kódoló gén nélkül) a mellékelt szekvencialista szerinti 2. azonosítószámú szekvenciájú lehet.

A pBR322 vektor komponenseit, valamint a csirke annexin-V-génjéből kódon-optimálással levezetett annexin-V-gént tartalmazó expressziós vektor a mellékelt szekvencialista szerinti 3. azonosítószámú szekvenciával rendelkezhet. Ebben a szekvenciában az annexin V leolvasási fázisa két járulékos stopkódot tartalmaz. A pKK223-3 vektor komponenseit és a csirke annexin-V-génjét tartalmazó expresz-

sziós vektor a mellékelt szekvencialista szerinti 4. azonosítószámú szekvenciájú lehet.

A találmány további tárgya a találmány szerinti expressziós vektort tartalmazó *E. coli* sejt. Az *E. coli* sejt előnyösen BL21 törzsű. Ez a törzs például a Novagen Inc. cégtől (601 Science Drive, Madison, WI 53711, USA) szerezhető be. Ez a sejt különösen alkalmasnak bizonyult az annexin V expressziójához. *E. coli* sejtként egy lac I^q-törzsből, különösen a JM105 törzsből származó *E. coli* sejt is alkalmazható. A lac I^q-törzsek valamelyikéből származó *E. coli* sejt annexin V expresszálasához különösen olyan expressziós vektor esetén alkalmas, amelyben az első promóter a tac-promóter. A JM105 törzs sejtjei például az American Type Culture Collection (ATCC) gyűjteménytől (Manassas, VA 20108, USA) szerezhetők be.

A találmány továbbá annexin V expressziójához alkalmas expressziós vektor előállítására irányuló eljárásra is vonatkozik, amelyre jellemző, hogy

a1) a pBR322 vektor saját replikációjához nem szükséges komponenseinek részben vagy teljesen történő eltávolításával vagy a pBR322 vektor legalább a replikációjához szükséges komponenseinek PCR-amplifikálásával, majd ezt

követő ligálásával első vektort állítunk elő,

a leolvasás irányában egymást követően első promótert, represszorra specifikus kötőhelyet, prokarióta riboszómakötőhelynek megfelelő szekvenciát, klónozási helyet és transzkripció terminátort tartalmazó expressziós tartományt szintetizálunk, majd



az expressziós tartományt a pBR322 vektorba, a fenti első vektorba vagy ezekből a vektorokból a jelen eljárás egyik lépésével keletkezett vektorba beillesztjük, vagy

a2) a pKK223-3 vektor saját replikációjához nem szükséges komponenseinek - kivéve a klónozási hellyel rendelkező expressziós tartományt - részben vagy teljesen történő eltávolításával vagy a klónozási hellyel rendelkező expressziós tartomány és a pKK223-3 vektor legalább a replikációjához szükséges komponenseinek PCR-amplifikálásával, majd ezt követő ligálásával első vektort állítunk elő, és

b) amennyiben az első vektorban nincs működőképes antibiotikum-rezisztenciagén, a pBR322 vektorba, a pKK223-3 vektorba, az első vektorba vagy ezekből a vektorokból a jelen eljárás egyik lépésével keletkezett vektorba működőképes antibiotikum-rezisztenciagént illesztünk be, és

c) a klónozási helybe annexin-V-öt kódoló gént illesztünk be.

A beillesztés és az eltávolítás általában a szokásos klónozási lépésekkel történik. Magától értetődik, hogy a b) és a c) lépést mind a1), mind a2) első lépés esetén kell elvégezni. Az a1) lépés során az eltávolítás vagy a PCR-amplifikálás alanya a pBR223 vektor vagy más, az eljárással, különösen az expressziós tartomány beillesztésével keletkezett vektor lehet. Ha az a1) vagy a2) lépés előtt a vektorban van már expressziós tartomány, ez a PCR-amplifikálás során a vektor komponenseivel együtt összefüggően amplifikálódik. A ligálásra azért van szükség, hogy a PCR-amplifikálás során keletkező szabad végeket vektorrá zár-

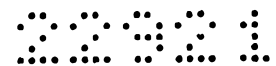
juk. Ennek során a vektor szabad végeit egymással vagy egy beilleszteni kívánt DNS-szakasz, különösen az expressziós tartomány vagy az annexin-V-öt kódoló gén szabad végeivel ligálhatjuk. Az antibiotikum-rezisztenciagén akkor működőképes, ha beillesztése után második promóter az antibiotikum-rezisztenciagén expresszióját lehetővé teszi. A működőképes antibiotikum-rezisztenciagén a második promótert tartalmazza, ha ez nincs meg a vektorban.

Az annexin-V-öt kódoló gén csirkéből származhat. Az annexin V-öt kódoló génben néhány kódot olyanra cserélhetünk, amelynek használata *E. coli*-ban preferált. Az ilyen gén-optimalás irányított mutagenézissel vagy új szintézissel történhet. Az eljárás egyik kiviteli példája szerint az annexin V-öt kódoló gén 3'-végén legalább egy járulékos stop-kódot illesztünk a gén leolvasási fázisába. Különösen előnyösen két járulékos stop-kódot alkalmazunk. A stop-kódot előnyösen olyan linker segítségével illesztjük be, amelynek szensz-szekvenciája a mellékelt szekvencialista szerinti 5. azonosítószámú, antiszensz-szekvenciája a 6. azonosítószámú szekvenciának felel meg. A beillesztés előnyösen a klónozási helybe való beépítés előtt történik annexin V-öt kódoló cDNS-be (beillesztésen itt a terminális hozzáillesztést is értjük).

A mellékelt szekvencialista szerinti 5. azonosítószámú és 6. azonosítószámú szekvenciájú linker hozzáillesztése előnyösen egy, az annexin-V-cDNS-ben jelen lévő Bse RI restriktációs hasítóhelybe történik.



Az első promóter előnyösen tac-promóter. A represszor Lac-represszor lehet. A transzkripció terminátor előnyösen az *E. coli*-ből származó rrnB T1 vagy rrnB T2 transzkripció terminátor. Az is lehetséges, hogy mind rrnB1 T1, mind rrnB T2 transzkripció terminátorként szerepel. Az első vektor előállításánál előnyösen az ampicillin-rezisztenciagént és/vagy a tetraciklin-rezisztenciagén legalább egy részét eltávolítjuk vagy nem PCR-amplifikáljuk. Az antibiotikum-rezisztenciagént beillesztés előtt PCR-amplifikálhatjuk vagy plazmidból izolálhatjuk. Amennyiben a vektorban az antibiotikum-rezisztenciagén expresszióját lehetővé tevő promóter van, nincs szükség a második promóter beillesztésére. Az antibiotikum-rezisztenciagén előnyösen kanamicin-rezisztenciagén, különösen a pACYC177 vektor vagy az *E. coli*-ből származó Tn903 transzpozon kanamicin-rezisztenciagénje. Az antibiotikum-rezisztenciagént második promóterrel, különösen a pACYC177 vektorból származó pK-promóterrel együtt illeszthetjük be. Az antibiotikum-rezisztenciagént a második promóterrel együtt előnyösen a pBR322 vektorból származó Eco RI és Sty I restrikciós hasítóhelyeken vagy a pKK223-3 vektorból származó Eco RI restrikciós hasítóhelyen illesztjük be. Ez magában foglalja a magába a pBR322 vagy pKK223-3 vektorba történő beillesztést is. Az egyik kiviteli példa szerint a kanamicin-rezisztenciagént a második, pK promóterrel együtt a pACYC177 vektor 1816-2771. nukleotid közötti szekvenciájának PCR-amplifikálásával állítjuk elő. Az expressziós tartományt előnyösen a pBR322 vektorból származó Ban I és Eco RI restrikciós hasítóhelyeken illesztjük



be. Az expressziós tartományt azonban magába a pBR322 vektorba is beilleszthetjük. Egyik megvalósítási mód szerint az expressziós tartomány - az annexin V-öt kódoló gén nélkül - a mellékelt szekvencialista szerinti 1. azonosítószámú szekvenciájú.

Különösen előnyös, ha a klónozási helyen kívül eső, II. osztálybeli, ATG nukleotidsort tartalmazó felismerő szekvenciával rendelkező restrikciós endonukleáz hasítóhelyét előnyösen irányított mutagenézissel eltávolítjuk vagy úgy módosítjuk, hogy a restrikciós endonukleáz ott már nem vághat. Az eltávolításnak vagy módosításnak az expresszálni kívánt gén beillesztése előtt kell történnie, mert csak így hasznosíthatók a felismerő szekvenciában előforduló ATG nukleotidsor fent említett előnyei. A restrikciós endonukleáz előnyösen Nde I vagy Nco I. Az egyik megvalósítási forma szerint az expressziós vektor - az annexin V-öt kódoló gén nélkül - a mellékelt szekvencialista szerinti 2. azonosítószámú szekvenciával rendelkezik. A teljes expressziós vektor szekvenciája a mellékelt szekvencialista 3. azonosítószámú szekvenciának felelhet meg. Ez a szekvencia egy, a csirke annexin-V-génjéből kódon-optimálással kapott gént tartalmaz. Ez a szekvencia az annexin V leolvasási fázisában két járulékos stop-kódot tartalmaz. Az expressziós vektor szekvenciája a mellékelt szekvencialista 4. azonosítószámú szekvenciának is felelhet meg.

Az alábbiakban a találmányt lehetséges klónozási sémák segítségével ismertetjük. A rajzokon az

1. ábra a pACYC177 vektorból vett kanamicin-rezisztenciagén és a hozzá való pK-promóter PCR-amplifikációs termékének a pBR322 vektorba történő beillesztését és a

2. ábra az így kapott vektor Nde I restrikciós hasítóhelyének eltávolítását mutatja. A

3. ábra az expressziós tartománynak a 2. ábra szerint kapott vektorba való beillesztését szemlélteti.

Az 1. ábrán mutatott pACYC177 vektornak a kanamicin-rezisztenciagént és a hozzá való pK-promótert magukban foglaló 1816-2771. nukleotidjait PCR-reakció segítségével amplifikáljuk. A reakció termékét az Eco RI és Sty I restrikciós enzimekkel emésztjük, majd a szintén ezekkel az enzimekkel emésztett pBR322 vektorba klónozzuk.

Az így kapott vektorból az Nde I restrikciós hasítóhelyet irányított mutagenézis segítségével eltávolítjuk. Ezt a 2. ábra vázlatosan mutatja. A szintetikusan előállított expressziós tartománynak a kapott vektor Ban I és Eco RI restrikciós hasítóhelyei közé történő beklónozását a 3. ábra szemlélteti vázlatosan.

Csirkemájból vett poli-A⁺-RNS-t fordítottn átíratunk össz-cDNS előállítására céljából. Az össz-cDNS-ből az annexin V-öt kódoló cDNS-t PCR segítségével amplifikáljuk. A PCR során megfelelő primerekkel az Nde I és Bam HI restrikciós endonukleázok számára hasítóhelyet vittünk be, ezeken az amplifikált c-DNS-t most hasítjuk. Ezt a c-DNS-t a vektor SD jellel jelölt riboszómakötőhely és T1 jellel jelölt transzkripció terminátor közötti tartományában szintén

meglévő Bam HI és Nde I restrikciós hasítóhelyek közé klónozzuk a vektorba.

Egy másik klónozási séma szerint az ampicillin-rezisztenciagén és a hozzá való promóter kivételével a pKK223-3 vektor teljes szekvenciáját PCR segítségével amplifikáljuk. Az ehhez alkalmazott primerek szekvenciája a mellékelt szekvencialista szerinti 6. azonosítószámú, ill. 7. azonosítószámú szekvenciának felel meg. Az amplifikált szekvenciát a Bgl II restrikciós enzimnek a primerekkel bevitt hasítóhelyein vágjuk. Az *E. coli* Tn903 transzpozonjából származó kanamicin-rezisztenciagént a pUC4K vektor fragmenseként e vektort a Bam HI restrikciós endonukleázzal emésztve nyerjük. A kanamicin-rezisztenciagént tartalmazó fragmenst és az amplifikált szekvenciát a Bam HI és Bgl II enzimekkel végzett emésztés során a vágás helyén keletkezett kompatibilis ragadó végeknél első vektorrá ligáljuk. Az ebben a vektorban meglévő, a pKK223-3 vektorból származó expressziós tartományban található klónozási helyet az Eco RI restrikciós endonukleázzal vágjuk. Az ennek során keletkező túlnyúló végeket DNS-polimeráz I Klenow-fragmense segítségével feltöltjük és lúgos foszfatázzal defoszforilezzük.

Embrionális csirke fibroblasztokból poli-A⁺-RNS-t izolálunk, majd fordított transzkripcióval cDNS-t nyerünk belőle. Ebből PCR segítségével amplifikáljuk az annexin V-öt kódoló c-DNS-t. Ezt először a Noc I, majd a Bam HI restrikciós endonukleázzal emésztjük. Az annexin V-öt kódoló fragmens túlnyúló végeit a DNS-polimeráz I Klenow-fragmense

segítségével feltöltjük. Az így kapott fragmenst az Eco RI enzimmel vágott, feltöltött és defoszforilezett első vektorral találmány szerinti expressziós vektorrá ligáljuk.



<120> Expressziós vektor

<130> 412032EH

<140>

<141>

<160> 6

<170> PatentIn Ver. 2. 1

<210> 1

<211> 181

<212> DNA

<213> Mesterséges szekvencia

<220>

<223> Mesterséges szekvencia leírása:
Szintetikus linker

<400> 1

```
gcgctgcagg cacctgttga caattaatca tcggctcgta taatgtgtgg aattgtgagc 60
ggataacaat tatataagga ggtatatcat atgggcccat tctagaggat ccggtaatta 120
attaatgcat aaaacgaaag gctcagtcga aagactgggc ctttcgtttt atgaattccg 180
g                                                                 181
```

<210> 2

<211> 3071

<212> DNA

<213> Mesterséges szekvencia

<220>

<223> Mesterséges szekvencia leírása:
Vektor annexin V-gén nélkül

<400> 2

```
ggcacctggt gacaattaat catcggtcgc tataatgtgt ggaattgtga gcggataaca 60
attatataag gaggtatatac atatgggcc attctagagg atccggtaat taattaatgc 120
ataaaacgaa aggctcagtc gaaagactgg gcctttcgtt ttatgaattc gccacgttgt 180
gtctcaaaat ctctgatgtt acattgcaca agataaaaat atatcatcat gaacaataaa 240
actgtctgct tacataaaca gtaatacaag ggggtgttatg agccatattc aacgggaaac 300
gtcttgctcg aggccgcgat taaattccaa catggatgct gatattatag ggtataaatg 360
ggctcgcgat aatgtcgggc aatcaggtgc gacaatctat cgattgtatg ggaagcccga 420
tgcgccagag ttgtttctga aacatggcaa aggtagcgtt gccaatgatg ttacagatga 480
```

gatggtcaga ctaaactggc tgacggaatt tatgcctctt ccgaccatca agcatttcat 540
 ccgtactcct gatgatgcat gggtactcac cactgcgatc cccgggaaaa cagcattcca 600
 ggtattagaa gaatatcctg attcaggtga aaatatgtt gatgcgctgg cagtgttctt 660
 ggcgcgggtg cattcgattc ctgtttgtaa ttgtcctttt aacagcgatc gcgtatttcg 720
 tctcgctcag gcgcaatcac gaatgaataa cggtttggtt gatgcgagtg attttgatga 780
 cgagcgtaat ggctgggectg ttgaacaagt ctggaaagaa atgcataagc ttttgccatt 840
 ctcaaccgat tcagtcgtca ctcatgggtga tttctcactt gataacctta tttttgacga 900
 ggggaaatta ataggttgta ttgatgttg acgagtcgga atcgcagacc gataccagga 960
 tcttgccatc ctatggaact gcctcgggtga gttttctcct tcattacaga aacggctttt 1020
 tcaaaaatat ggtattgata atcctgatat gaataaattg cagtttctt tgatgctcga 1080
 tgagtttttc taatcagaat tggttaattg gttgtaaacac tggcagcctt ggcagaacat 1140
 atccatcgcg tccgccatct ccagcagccg cagcggcgcg atctcgggca gcgttggggc 1200
 ctggccacgg gtgcgcatga tctgtctect gtggttgagg acccggttag gctggcgggg 1260
 ttgccttact ggtagcaga atgaatcac gatacgcgag cgaacgtgaa gcgactgctg 1320
 ctgcaaaacg tctgcgacct gagcaacaac atgaatggtc ttcggtttcc gtgtttcgt 1380
 aagtctggaa acgcggaagt cagcgccctg caccattatg ttccggatct gcatcgcagg 1440
 atgctgctgg ctaccctgtg gaacacctac atctgtatta acgaagcgtt ggcattgacc 1500
 ctgagtgtt tttctctggt cccgccgcat ccataccgcc agttgtttac cctcacaacg 1560
 ttccagtaac cgggcatgtt catcatcagt aacccgctatc gtgagcatcc tctctcgttt 1620
 catcggtatc attaccccca tgaacagaaa tcccccttac acggaggcat cagtgaacaa 1680
 acaggaaaaa accgccctta acatggcccg ctttatcaga agccagacat taacgcttct 1740
 ggagaaaactc aacgagctgg acgcggatga acaggcagac atctgtgaat cgcttcacga 1800
 ccacgctgat gagctttacc gcagctgcct cgcgcgtttc ggtgatgacg gtgaaaacct 1860
 ctgacacatg cagctcccg agacgggtcac agcttgtctg taagcggatg cggggagcag 1920
 acaagcccg cagggcgctg cagcgggtgt tggcgggtgt cggggcgag ccatgaccca 1980
 gtcacgtagc gatagcggag tgtatactgg cttactatg cggcatcaga gcagattgta 2040
 ctgagagtgc accgtatgcg gtgtgaaata ccgcacagat gcgtaaggag aaaataccgc 2100
 atcaggcgct ctcccgcttc ctgcctcact gactcgctgc gctcggctgt tccgctgcgg 2160
 cgagcgggtat cagctcactc aaaggcggtg atacggttat ccacagaatc aggggataac 2220
 gcaggaaaga acatgtgagc aaaaggccag caaaaggcca ggaaccgtaa aaaggccgcg 2280
 ttgctggcgt ttttccatag gctccgcccc cctgacgagc atcacaaaaa tcgacgctca 2340
 agtcagaggt ggcgaaacc gacaggacta taaagatacc aggcgtttcc ccctggaagc 2400
 tccctcgtgc gctctcctgt tccgaccctg ccgcttaccg gatacctgtc cgcctttctc 2460
 ccttcgggaa gcgtggcgtt ttctcatagc tcacgctgta ggtatctcag ttcgggtgtag 2520
 gtcgttcgtt ccaagctggg ctgtgtgcac gaaccccccg ttcagcccg cgcgtgcgcc 2580
 ttatccggta actatcgtct tgagtcacac ccggtgaagc acgacttate gccactggca 2640
 gcagccactg gtaacaggat tagcagagcg aggtatgtag gcggtgctac agagtctctt 2700
 aagtgggtggc ctaactacgg ctacactaga aggacagtat ttggtatctg cgctctgctg 2760
 aagccagtta ccttcggaaa aagagttggt agctcttgat ccggcaaaca aaccaccgct 2820
 ggtagcgggtg gtttttttgt ttgcaagcag cagattacgc gcagaaaaaa aggatctcaa 2880
 gaagatcctt tgatcttttc tacggggtct gacgctcagt ggaacgaaaa ctcacgttaa 2940
 gggatttttg tcatgagatt atcaaaaagg atcttcacct agatcctttt aaattaaaaa 3000
 tgaagtttta aatcaatcta aagtatatat gagtaaactt ggtctgacag ttaccaatgc 3060
 ttaatcagtg a 3071

<210> 2
 <211> 4044
 <212> DNA



<213> Mesterséges szekvencia

<220>

<223> Mesterséges szekvencia leírása:
Expressziós vektor

<400> 3

ggcacctgtt gacaattaat catcggtctg tataatgtgt ggaattgtga gcggataaca 60
attatataag gaggtatatac atatggcgaa gtatacaaga ggcaccgtga cagcattctc 120
tcctttttgat gccagagctg atgcagaagc ccttcgcaag gccatgaagg gaatggggac 180
tgatgaagag acaattctga agatccttac cagcagaaat aatgctcaac gtcaagaaat 240
tgcatctgct tttaaaacac tgtttggcag ggatcttgtg gatgacctga aatcagaact 300
tactggcaag tttgaaacac tgatggtatc tttgatgaga ccagcacgta tttttgatgc 360
tcatgcactg aagcatgcaa tcaagggagc aggaaccaat gagaaagtgt tgactgaaat 420
tcttgccctcc agaacacctg ctgaagtga gaattattaa cagggtttata tgcaagagta 480
tgaggccaac ttggaggata agatcacagg agagacatca ggccattttc agagactgct 540
ggtggctctg ctgcaggcaa atagagatcc tgatggcaga gttgacgagg ctcttgttga 600
gaaggatgct caggtcttgt ttagagctgg ggagctaaaa tgggggaacag atgaagaaac 660
attcatcacc atcttgggaa ctggaagtgt ttctcattta aggagggtgt ttgacaaata 720
catgactatt tctggctttc aaattgaaga aaccattgac cgtgaaacct ctggtgattt 780
ggagaagttg cttttggcag ttgtgaagtg catccgaagt gtgcctgctt attttctga 840
aactttgtat tattccatga aaggggctgg cactgatgat gataccctga tcagagtcac 900
ggtttcaaga agtgaaatcg acctgttga tattagacat gaattcagaa agaattttgc 960
gaaatcgttg tatcagatga ttcagaaaga tacatctggg gactacagga aggcctgct 1020
gctcctctgc ggcggtgatg acgaataata attaatatt aataatctgc aggatccggt 1080
aattaattaa tgcataaaac gaaaggctca gtcgaaagac tgggcctttc gttttatgaa 1140
ttcgccacgt tgtgtctcaa aatctctgat gttacattgc acaagataaa aatatatcat 1200
catgaacaat aaaactgtct gcttacataa acagtaatac aaggggtgtt atgagccata 1260
ttcaacggga aacgtcttgc tcgaggccgc gattaaatc caacatggat gctgatttat 1320
atgggtataa atgggctcgc gataatgtcg ggcaatcagg tgcgacaatc tatcgattgt 1380
atgggaagcc cgatgcgcca gagttgttgc tgaaacatgg caaaggtagc gttgccaatg 1440
atgttacaga tgagatggc agactaaact ggctgacgga atttatgcct cttccgacca 1500
tcaagcattt tatccgtact cctgatgatg catggttact caccactgcg atccccggga 1560
aaacagcatt ccaggtatta gaagaatata ctgattcagg tgaaaatatt gttgatgcgc 1620
tggcagtgtt cctgcgcccgg ttgcattcga ttctgtttg taattgtcct tttaacagcg 1680
atcgcgattt tcgtctcgtc caggcgcaat cacgaatgaa taacggtttg gttgatgcga 1740
gtgattttga tgacgagcgt aatggctggc ctgttgaaaca agtctggaaa gaaatgcata 1800
agctttttgcc attctcaccg gattcagtcg tactcatgg tgattttctca cttgataacc 1860
ttatttttga cgaggggaaa ttaatagggt gtattgatgt tggacgagtc ggaatcgag 1920
accgatacca ggatcttgcc atcctatgga actgctcgg tgagttttct cttcattac 1980
agaaacggct ttttcaaaaa tatggtattg ataactctga tatgaataaa ttgcagtttc 2040
atttgatgct cgatgagttt ttctaatacag aattggttaa ttggttgtaa cactggcagc 2100
cttggcagaa catatccatc gcgtccgcca tctccagcag ccgcacgcgg cgcctctcg 2160
gcagcggttg gtcctggcca cgggtgcgca tgatcggtc cctgtcggtg aggaccggc 2220
taggctggcg gggttgcctt actggttagc agaataatc accgatacgc gagcgaacgt 2280
gaagcgactg ctgctgcaaa acgtctgcga cctgagcaac aacatgaatg gtcttcgggt 2340
tcctgttttc gtaaagtctg gaaacgcgga agtcagcgcc ctgcaccatt atgttccgga 2400
tctgcatcgc aggatgctgc tggctacct gtggaacacc tacatctgta ttaacgaagc 2460



gctggcattg accctgagtg atttttctct ggtcccgccg catccatacc gccagttgtt 2520
taccctcaca acgttccagt aaccgggcat gttcatcate agtaaccggt atcgtgagca 2580
tctctctctg tttcatcggt atcattaccc ccatgaacag aaatccccct tacacggagg 2640
catcagtgac caaacaggaa aaaaccgccc ttaacatggc ccgctttatc agaagccaga 2700
cattaacgct tctggagaaa ctcaacgagc tggacgcgga tgaacaggca gacatctgtg 2760
aatcgcttca cgaccacgct gatgagcttt accgcagctg cctcgcgcgt ttcgggtgatg 2820
acggtgaaaa cctctgacac atgcagctcc cggagacggg cacagcttgt ctgtaagcgg 2880
atgccgggag cagacaagcc cgtcagggcg cgtcagcggg tgttggcggg tgcggggcg 2940
cagccatgac ccagtcacgt agegatagcg gagtgatatac tggcttaact atgcggcate 3000
agagcagatt gtactgagag tgcaccgtat gcggtgtgaa ataccgcaca gatgcgtaag 3060
gagaaaatac cgcatcaggc gctcttcgc ttcctcgctc actgactcgc tgcgctcggt 3120
cgttcggctg cggcgagcgg tatcagctca ctcaaaggcg gtaatacggg tatccacaga 3180
atcaggggat aacgcaggaa agaacatgtg agcaaaaaggc cagcaaaagg ccaggaaccg 3240
taaaaaggcc gcgttgctgg cgtttttcca taggctccgc cccctgacg agcatcacia 3300
aaatcgacgc tcaagtcaga ggtggcgaac cccgacagga ctataaagat accaggcggt 3360
tccccctgga agtccctcg tgcgctctcc tgttcgacc ctgcccgtta cgggatacct 3420
gtccgccttt ctcccttcgg gaagcgtggc gctttctcat agctcacgct gtaggtatct 3480
cagttcggtg taggtcggtc gctccaagct gggctgtgtg cacgaacccc cgttcagcc 3540
cgaccgctgc gccttatccg gtaactatcg tcttgagtc aaccggtaa gacacgactt 3600
atcgccactg gcagcagcca ctggtaacag gattagcaga gcgaggtatg taggcgggtg 3660
tacagagttc ttgaagtggg ggcctaacta cggctacact agaaggacag tatttggtat 3720
ctgcgctctg ctgaagccag ttaccttcgg aaaaagagtt ggtagctctt gatccggcaa 3780
acaaaccacc gctggtagcg gtggtttttt tgtttgcaag cagcagatta cgcgcagaaa 3840
aaaaggatct caagaagatc ctttgatctt ttctacgggg tctgacgctc agtggaaacg 3900
aaactcacgt taagggattt tgggtcatgag attatcaaaa aggatcttca cctagatcct 3960
tttaaattaa aaatgaagtt ttaaataat cttaaagtata tatgagtaaa cttgggtctga 4020
cagttaccaa tgcttaata gtga 4044

<210> 4

<211> 5873

<212> DNA

<213> Mesterséges szekvencia

<220>

<223> Mesterséges szekvencia leírása:

Expressziós vektor

<400> 4

gaattcatgg cgaagtatac aagaggcacc gtgacagcat tctctccttt tgatgccaga 60
gctgatgcag aagcccttcg caaggccatg aagggaatgg ggactgatga agagacaatt 120
ctgaagatcc ttaccagcag aaataatgct caacgtcaag aaattgcac tgccttttaa 180
acactgtttg gcagggatct tgtggatgac ctgaaatcag aacttactgg caagtttgaa 240
acactgatgg tatctttgat gagaccagca cgtatttttg atgctcatgc actgaagcat 300
gctatcaagg gagcaggaac caatgagaaa gtgttgactg aaattcttgc ctccagaaca 360
cctgctgaag tgcagaatat taaacaggtt tatatgcaag agtatgaggg caacttgagg 420
gataagatca caggagagac atcaggccat ttccagagac tgctgggtgg cctgctgcag 480
gcaaatagag atcctgatgg cagagttgac gaggtctctt ttgagaagga tgcctcaggtc 540
ttgttttagag ctggggagct aaaatgggga acagatgaag aaacattcat caccatcttg 600

ggaactcgaa gtgtttctca tttgaggagg gtgtttgaca aatacatgac tattttctggc 660
 tttcaaattg aagaaaccat tgaccgtgaa acctctggtg atttggagaa gttgcttttg 720
 gcagttgtga agtgcacccg aagtgtgcct gcttattttg ctgaaacttt gtattattct 780
 atgaaagggg ctggcactga tgatgatacc ctgatcagag tcatggtttc aagaagtga 840
 atcgacctgt tggatattag acatgaattc agaaagaatt ttgcgaaatc gttgtatcag 900
 atgattcaga aagatacatc tggggactac aggaaggcac tcctgctcct ctgtggtgga 960
 gatgatgagt aatggatcaa ttcccgggga tccgtcgacc tgcagccaag cttctgtttt 1020
 ggcggatgag agaagatttt cagcctgata cagattaaat cagaacgcag aagcggctctg 1080
 ataaaacaga atttgcctgg cggcagtagc gcggtggtcc cacctgacct catgccgaac 1140
 tcagaagtga aacgccgtag cggcgatggt agtgtggggt ctcccatgc gagagtaggg 1200
 aactgccagg catcaaataa aacgaaaggc tcagtcgaaa gactgggcct ttcgttttat 1260
 ctgttggttg tcggtgaacg ctctcctgag taggacaaat ccgccgggag cggatttgaa 1320
 cgttgcgaaag caacggcccc gaggggtggc ggcaggacgc ccgccataaa ctgccaggca 1380
 tcaaattaag cagaaggcca tcctgacgga tggcctttt gcgtttctac aaactcagat 1440
 ccgtcgacct gcaggggggg gggggaaagc cacgttgtgt ctcaaaatct ctgatgttac 1500
 attgcacaag ataaaaatat atcatcatga acaataaaac tgtctgctta cataaacagt 1560
 aatacaaggg gtgttatgag ccatattcaa cgggaaacgt cttgctcgag gccgcgatta 1620
 aattccaaca tggatgctga tttatatggg tataaatggg ctccgataa tgcgggcaa 1680
 tcaggtgcga caatctatcg attgtatggg aagcccgatg cgccagagtt gtttctgaaa 1740
 catggcaaa gtagcggtgc caatgatgtt acagatgaga tggtcagact aaactggctg 1800
 acggaattta tgcctcttcc gaccatcaag ctttttatcc gtactcctga tgatgcattg 1860
 ttactcacca ctgcgatccc cgggaaaaca gcattccagg tattagaaga atatcctgat 1920
 tcaggtgaaa atattgttga tgcgctggca gtgttctgc gccggttgca ttcgattcct 1980
 gtttgtaatt gtctttttaa cagcgatcgc gtatttcgtc tcgctcaggc gcaatcacga 2040
 atgaataacg gtttggttga tgcgagtgat tttgatgacg agcgtaatgg ctggcctgtt 2100
 gaacaagtct ggaaagaaat gcataagctt ttgccattct caccggattc agtcgtcact 2160
 catggtgatt tctcacttga taaccttatt tttgacgagg ggaaattaat aggttgatt 2220
 gatgttgac gagtcggaat cgcagaccga taccaggatc ttgccatcct atggaactgc 2280
 ctcggtgagt tttctccttc attacagaaa cggctttttc aaaaatatgg tattgataat 2340
 cctgatatga ataaattgca gtttcatttg atgctcgatg agtttttcta atcagaattg 2400
 gtttaattgg tgaacactg gcagagcatt acgctgactt gacgggacgg cggctttgtt 2460
 gaataaatcg aacttttgct gagttgaagg atcagatcac gcattctccc gacaacgcag 2520
 accgttccgt ggcaaagcaa agtttcaaaa tcaccaactg gtccacctac aacaaagctc 2580
 tcatcaaccg tggctccctc actttctggc tggatgatgg ggcgattcag gcctggtatg 2640
 agtcagcaac acctcttca cgaggcagac ctccagcccc cccccccct gcaggtcgac 2700
 ggatctgacc aagtttactc atatatactt tagattgatt taaaacttca tttttaattt 2760
 aaaaggatct aggtgaagat cctttttgat aatctcatga ccaaaatccc ttaacgtgag 2820
 ttttcgttcc actgagcgtc agaccccgta gaaaagatca aaggatcttc ttgagatcct 2880
 ttttttctgc gcgtaatctg ctgcttgcaa acaaaaaaac caccgctacc agcgggtggt 2940
 tgtttgccgg atcaagagct accaactctt ttccgaagg taactggctt cagcagagcg 3000
 cagataccaa atactgtcct tctagttag cgtagttag gccaccactt caagaactct 3060
 gtagcaccgc ctacatacct cgtctgtcta atcctgttac cagtggctgc tgccagtggc 3120
 gataagtcgt gtcttaccgg gttggactca agacgatagt taccggataa ggcgcagcgg 3180
 tcgggctgaa cgggggggtc gtgcacacag ccagcttg agcgaacgac ctacaccgaa 3240
 ctgagatacc tacagcgtga gctatgagaa agcgccacgc ttcccgaagg gagaaaggcg 3300
 gacaggtatc cggtaagcgg cagggtcgga acaggagagc gcacgagggg gcttccaggg 3360
 ggaaacgcct ggtatcttta tagtcctgtc gggtttcgcc acctctgact tgagcgtcga 3420
 tttttgtgat gctcgtcagg ggggcggagc ctatggaaaa acgccagcaa cgcggccttt 3480

.
3540.

ttacggttcc tggccttttg ctggcctttt gctcacatgt tctttcctgc gttatccct.3540.
gattctgtgg ataaccgtat taccgccttt gagtgagctg ataccgctcg ccgcagccga 3600
acgaccgagc gcagcgagtc agtgagcgag gaagcggaag agcgctgat gcggtatttt 3660
ctccttacgc atctgtgcgg tatttcacac cgcatatggt gcaactctcag tacaatctgc 3720
tctgatgccg catagttaag ccagtataca ctccgctatc gctacgtgac tgggtcatgg 3780
ctgcgccccg acacccgccca acacccgctg acgcgccttg acgggcttgt ctgctcccg 3840
catccgctta cagacaagct gtgaccgtct ccgggagctg catgtgtcag aggttttcac 3900
cgtcatcacc gaaacgcgcg aggcagctgc ggtaaagctc atcagcgtgg tcgtgaagcg 3960
attcacagat gtctgcctgt tcatccgcgt ccagctcgtt gagtttctcc agaagcggtta 4020
atgtctggct tctgataaag cgggccatgt taaggcggt ttttctctgt ttggtcactt 4080
gatgcctccg tgtaaggggg aatttctgtt catgggggta atgataccga tgaaacgaga 4140
gaggatgctc acgatacggg ttactgatga tgaacatgcc cggttactgg aacgttgtga 4200
gggtaaacaa ctggcggtat ggatgcggcg ggaccagaga aaaatcactc aggggtcaatg 4260
ccagcgcttc gttaatacag atgtaggtgt tccacagggt agccagcagc atcctgcgat 4320
gcagatccgg aacataatgg tgcagggcgc tgacttccgc gtttccagac tttacgaaac 4380
acggaaaccg aagaccattc atgttggtgc tcaggctcga gacgttttgc agcagcagtc 4440
gcttcacgtt cgctcgcgta tcggtgattc attctgctaa ccagtaaggc aaccccgcca 4500
gcctagccgg gtctcaacg acaggagcac gatcatgcgc acccgtggcc aggacccaac 4560
gctgcccag atgcgccgcg tgcggctgct ggagatggcg gacgcgatgg atatgttctg 4620
ccaaggggtg gtttgcgcat tcacagttct ccgcaagaat tgattggctc caattcttgg 4680
agtgggtgaat ccgttagcga ggtgccgcg gcttccattc aggtcgaggt ggcccggctc 4740
catgcaccgc gacgcaacgc ggggaggcag acaaggata gggcggcgcc tacaatccat 4800
gccaacccgt tccatgtgct ccgcgaggcg gcataaatcg ccgtgacgat cagcgggtcca 4860
gtgatcgaag ttaggctggt aagagccgcg agcgatcctt gaagctgtcc ctgatggctg 4920
tcctctacct gcctggacag catggcctgc aacgcgggca tcccgatgcc gccggaagcg 4980
agaagaatca taatggggaa ggccatccag cctcgcgtcg cgaacgccag caagacgtag 5040
cccagcgctt cggccgccat gccggcgata atggcctgct tctcgcgaa acgttttggg 5100
gcgggaccag tgacgaaggc ttgagcgagg gcgtgcaaga ttccgaatac cgcaagcgac 5160
aggccgatca tcgtcgcgt ccagcgaaag cggctcctgc cgaaaatgac ccagagcgct 5220
gccggcacct gtctacgag ttgcatgata aagaagacag tcataagtgc ggcgacgata 5280
gtcatgccc gcgccaccg gaaggagctg actgggttga aggctctcaa gggcatcggg 5340
cgacgctctc ccttatgcga ctctgcat aggaagcagc ccagtagtag gttgaggccg 5400
ttgagcaccg ccgcgcgaag gaatggtgca tgcaaggaga tggcgcccaa cagtcctccg 5460
gccacggggc ctgccaccat acccacgccg aaacaagcgc tcatgagccc gaagtggcga 5520
gcccgatctt cccatcggt gatgtcggcg atataggcgc cagcaaccgc acctgtggcg 5580
ccggtgatgc cggccacgat gcgtccggcg tagaggatcc ggagcttate gactgcacgg 5640
tgcaccaatg cttctggcgt caggcagcca tcggaagctg tggatatggt gtgcaggtcg 5700
taaatactg cataattcgt gtcgtcaag gcgactccc gttctggata atgttttttg 5760
cgccgacatc ataacggttc tggcaaatat tctgaaatga gctgttgaca attaatactc 5820
ggctcgtata atgtgtggaa ttgtgagcgg ataacaattt cacacaggaa aca 5873

<210> 5

<211> 59

<212> DNA

<213> Mesterséges szekvencia

<220>

<223> Mesterséges szekvencia leírása:

00001

Egy linker szensz-szála (vezetőszál) egyenként 2 stop
kodonnal mindegyik azonos leolvasási fázisban

<400> 5

ccctgctgct cctctgcggc ggtgatgacg aataataatt aataattaat aatctgcag 59

<210> 6

<211> 65

<212> DNA

<213> Mesterséges szekvencia

<220>

<223> Mesterséges szekvencia leírása:

Egy linker szensz-szála (követőszál) egyenként 2 stop
kodonnal mindegyik azonos leolvasási fázisban

<400> 6

gatcctgcag attattaatt attaattatt attcgtcatc accgccgcag aggagcagca 60
gggcc 65

SZABADALMI IGÉNYPONTOK

1. Expressziós vektor, amely az alábbiakat tartalmazza:

- a pBR322 vagy pKK223-3 vektornak legalább azon komponenseit, amelyek saját replikációjához szükségesek,
- olyan expressziós tartományt, amely a leolvasás irányában egymást követően egy első promótert, represszorra specifikus kötőhelyet, prokarióta riboszómakötőhelynek megfelelő szekvenciát, annexin V-öt kódoló gént magában foglaló klónozási helyet és legalább egy transzkripció terminálót tartalmaz,
- legalább egy antibiotikum rezisztenciát közvetítő gént egy második promóterrel.

2. Az 1. igénypont szerinti expressziós vektor, amelyben az annexin V-öt kódoló gén csirkéből származik.

3. Az 1. vagy 2. igénypont szerinti expressziós vektor, amelynek annexin V-öt kódoló génjében a kódonok olyanokra vannak cserélve, amelyek használata *E. coli*-ban preferált.

4. Az 1-3. igénypontok bármelyike szerinti expressziós vektor, amelyben az annexin V-öt kódoló gén 3'-végén legalább egy járulékos stop-kódon, előnyösen két járulékos stop-kódon helyezkedik el.

5. Az 1-4. igénypontok bármelyike szerinti expressziós vektor, amelyben az első promóter tac-promóter.

6. Az 1-5. igénypontok bármelyike szerinti expressziós vektor, amelyben a represszor Lac-represszor.

7. Az 1-6. igénypontok bármelyike szerinti expressziós vektor, amelyben a transzkripció terminátor rrnB T1 vagy rrnB T2 terminátor vagy transzkripció terminátorként mind rrnB T1, mind rrnB T2 transzkripció terminátor szerepel.

8. Az 1-7. igénypontok bármelyike szerinti expressziós vektor, amely a pBR322 komponensei közül az ampicillin-rezisztenciagént és/vagy a tetraciklin-rezisztenciagént, a pKK223-3 vektor komponensei közül az ampicillin-rezisztenciagént nem vagy csak részben tartalmazza.

9. Az 1-8. igénypontok bármelyike szerinti expressziós vektor, amelynek antibiotikum-rezisztenciagénje kanamicin-rezisztenciagén, előnyösen a pACYC177 vektornak vagy az *E. coli* Tn903 transzpozonjának kanamicin-rezisztenciagénje.

10. Az 1-9. igénypontok bármelyike szerinti expressziós vektor, amelyben a második promóter a pACYC117 vektorból származó pK-promóter.

11. Az 1-10. igénypontok bármelyike szerinti expressziós vektor, amelyben a kanamicin-rezisztenciagén a második promóterrel együtt a pBR322 vektorból származó Eco RI és Sty I restrikciós hasítóhelyeken vagy a pKK223-3 vektorból származó Eco RI restrikciós hasítóhelyen van beillesztve az expressziós vektorba.

12. Az 1-11. igénypontok bármelyike szerinti expressziós vektor, amelyben a kanamicin-rezisztenciagén a második pK promóterrel együtt a pACYC177 vektor 1816. és 2771. nukleotid közötti szekvenciatartományában helyezkedik el.



13. Az 1-12. igénypont szerinti expressziós vektor, amelyben az expressziós tartomány a pBR322 vektorból származó Ban I és Eco RI restrikciós hasítóhelyek közé van beillesztve az expressziós vektorba.

14. Az 1-13. igénypontok bármelyike szerinti expressziós vektor, amelynek expressziós tartománya az annexin V-öt kódoló gén nélkül a mellékelt szekvencialista szerinti 1. azonosítószámú szekvenciájú.

15. Az 1-14. igénypontok bármelyike szerinti expressziós vektor, amely II. osztálybeli, ATG nukleotidsorral rendelkező felismerő szekvenciát tartalmazó restrikciós endonukleáz számára a klónozási helyen kívül hasítóhelyet nem tartalmaz.

16. A 15. igénypont szerinti expressziós vektor, amely a klónozási helyen kívül Nde I vagy Nco I restrikciós endonukleáz számára nem tartalmaz hasítóhelyet.

17. Az 1-16. igénypontok bármelyike szerinti expressziós vektor, amelynek expressziós tartománya az annexin V-öt kódoló gén nélkül a mellékelt szekvencialista szerinti 2. azonosítószámú szekvenciájú.

18. Az 1-17. igénypont szerinti expressziós vektor, amelynek szekvenciája a mellékelt szekvencialista szerinti 3. azonosítószámú vagy 4. azonosítószámú szekvenciának felel meg.

19. *E. coli* sejt, amely 1-18. igénypontok bármelyike szerinti expressziós vektort tartalmaz.

20. A 19. igénypont szerinti *E. coli* sejt, amely BL21 törzsbeli vagy egy lac I^q-törzshöz, előnyösen a JM105 sz. törzshöz tartozik.

21. Eljárás expressziós vektor előállítására, azzal jellemezve, hogy

a1) a pBR322 vektor saját replikációjához nem szükséges komponenseinek részben vagy teljesen történő eltávolításával vagy a pBR322 vektornak legalább a replikációjához szükséges komponenseinek PCR-amplifikálásával, majd ezt

követő ligálásával egy első vektort állítunk elő,

a leolvasás irányában egymást követően egy első promótert, represszorra specifikus kötőhelyet, prokarióta riboszómakötőhelynek megfelelő szekvenciát, klónozási helyet és transzkripció terminátort tartalmazó expressziós tartományt szintetizálunk, majd

az expressziós tartományt a pBR322 vektorba, a fenti első vektorba vagy ezekből a vektorokból a jelen eljárás egyik lépésével keletkezett vektorba beillesztjük, vagy

a2) a pKK223-3 vektor saját replikációjához nem szükséges komponenseinek - kivéve a klónozási hellyel rendelkező expressziós tartományt - részben vagy teljesen történő eltávolításával vagy a klónozási hellyel rendelkező expressziós tartománynak és a pKK223-3 vektor legalább a replikációjához szükséges komponenseinek PCR-amplifikálásával, majd ezt követő ligálásával egy első vektort állítunk elő, és

b) amennyiben az első vektorban nincs működőképes antibiotikum-rezisztenciagén, a pBR322 vektorba, a pKK223-3



vektorba, az első vektorba vagy ezekből a vektorokból a jelen eljárás egyik lépésével keletkezett vektorba működőképes antibiotikum-rezisztenciagént illesztünk be, és

c) a klónozási helybe annexin-V-öt kódoló gént illesztünk be.

22. A 21. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy csirkéből származó annexin V-öt kódoló gént alkalmazunk.

23. A 21. vagy 22. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy az annexin V-öt kódoló génben a kódonokat olyanokra cseréljük, amelyeknek használata *E. coli*-ban preferált.

24. A 21-23. igénypontok bármelyike szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy az annexin V-öt kódoló gén szekvenciájának 3'-végére legalább egy járulékos stop-kódot, előnyösen két járulékos stop-kódot illesztünk be a génnel azonos leolvasási fázisban.

25. A 24. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy a stop-kódot linker, előnyösen a mellékelt szekvencialista szerinti 5. azonosítószámú szekvenciájú szenszszálból és 6. azonosítószámú szekvenciájú antiszensz-szálból álló linker segítségével illesztjük be.

26. A 21-25. igénypontok bármelyike szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy első promóterként tac-promótert alkalmazunk.

27. A 21-26. igénypontok bármelyike szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy represszorként Lac-represszort alkalmazunk.



28. A 21-27. igénypontok bármelyike szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy transzkripciós terminátorként rrnB T1 vagy rrnB T2 transzkripciós terminátort vagy mind rrnB T1, mind rrnB T2 transzkripciós terminátort alkalmazunk.

29. A 21-28. igénypontok bármelyike szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy az első vektor előállításakor az ampicillin-rezisztenciagént és/vagy a tetraciklin-rezisztenciagén legalább egy részét eltávolítjuk vagy nem PCR-amplifikáljuk.

30. A 21-29. igénypontok bármelyike szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy beillesztés előtt az antibiotikum-rezisztenciagént PCR segítségével amplifikáljuk vagy plazmidből izoláljuk.

31. A 30. igénypont szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy antibiotikum-rezisztenciagéntként kanamicin-rezisztenciagént, előnyösen a pACYC177 vektorból vagy *E. coli* Tn903 transzpozonjából származó kanamicin-rezisztenciagént alkalmazunk.

32. A 21-31. igénypontok bármelyike szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy az antibiotikum-rezisztenciagént második promóterrel, előnyösen a pACYC177 vektorból származó pK-promóterrel együtt illesztjük be.

33. A 21-32. igénypontok bármelyike szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy az antibiotikum-rezisztenciagént a második promóterrel együtt a pBR322 vektorból származó Eco RI és Sty I restrikciós hasítóhelyeken vagy a pKK223-3 vektorból származó Eco RI restrikciós hasítóhelyen illesztjük be.

34. A 21-33. igénypontok bármelyike szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy a kanamicin-rezisztenciagént a második, pK-promóterrel együtt a pACYC177 vektor 1816. és 2771. nukleotid közötti szekvenciájának PCR-amplifikálásával nyerjük.

35. A 21-34. igénypontok bármelyike szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy az expressziós tartományt a pBR322 vektorból származó Ban I és Eco RI restrikciós hasítóhelyek közé illesztjük be.

36. A 21-35. igénypontok bármelyike szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy a beillesztendő expressziós tartomány az annexin V-öt kódoló gén nélkül a mellékelt szekvencialista szerinti 1. azonosítószámú szekvenciájú.

37. A 21-36. igénypontok bármelyike szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy II. osztálybeli, ATG nukleotidsorral rendelkező felismerő szekvenciát tartalmazó restrikciós endonukleáz hasítóhelyét, ha a klónozási helyen kívül van, előnyösen irányított mutagenézissel eltávolítjuk vagy úgy megváltoztatjuk, hogy a restrikciós endonukleáz ezen a helyen már nem tud hasítani.

38. A 37. igénypont szerinti eljárás, hogy az Nde I vagy Nco I restrikciós endonukleáz hasítóhelyét eltávolítjuk vagy megváltoztatjuk.

39. A 21-38. igénypontok bármelyike szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy az expressziós vektor az annexin V-öt kódoló gén nélkül a mellékelt szekvencialista szerinti 2. azonosítószámú szekvenciájú.

40. A 21-39. igénypontok bármelyike szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy az expressziós vektor az annexin V-öt kódoló gén nélkül a mellékelt szekvencialista szerinti 3. azonosítószámú vagy 4. azonosítószámú szekvenciájú.

A meghatalmazott:

DANUBIA

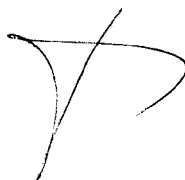
Szabadalmi és Védjegy Iroda Kft.



dr. Pethő Árpád

szabadalmi ügyvivő

23+3=26 old

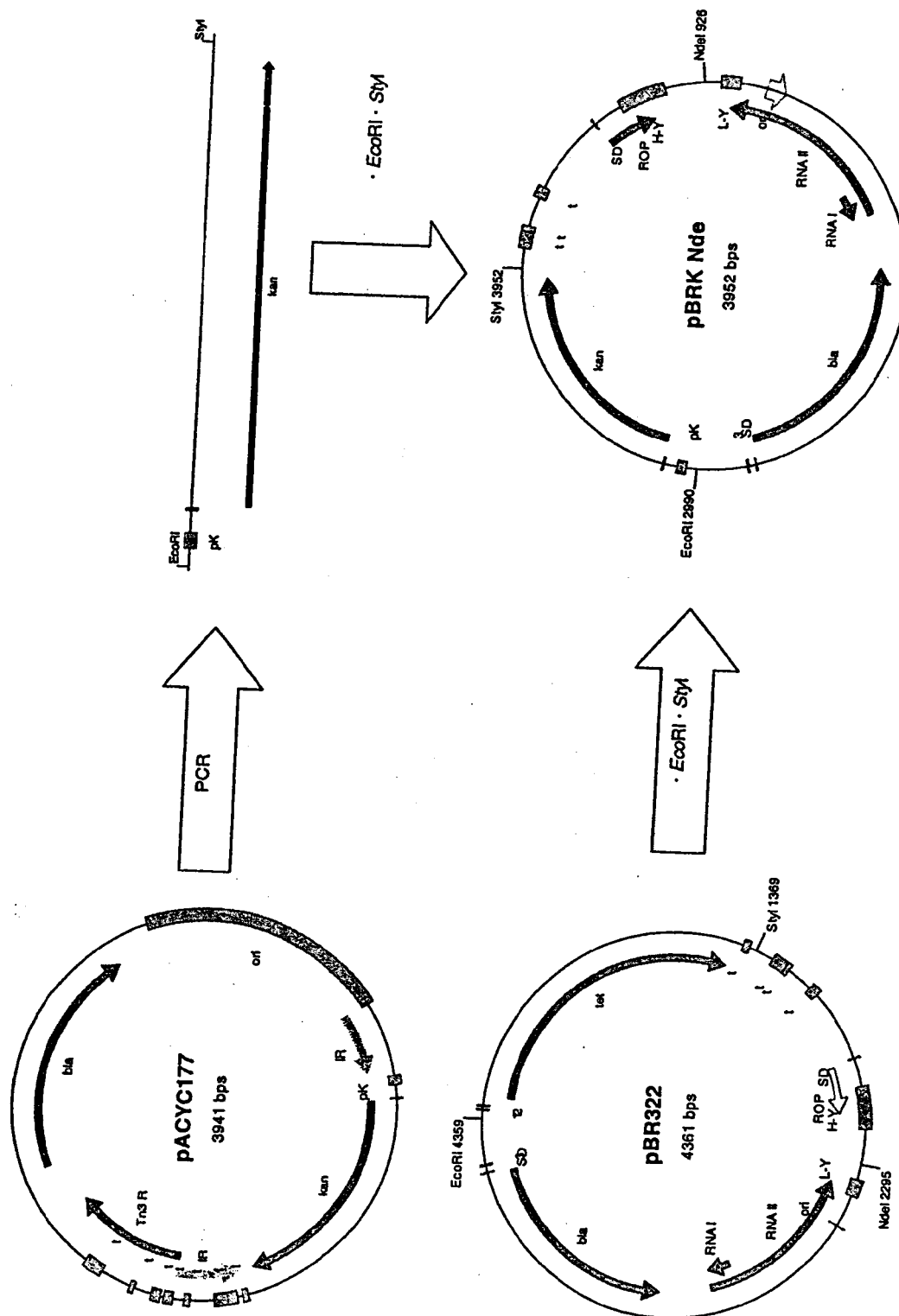


2003.07.01

P0200682

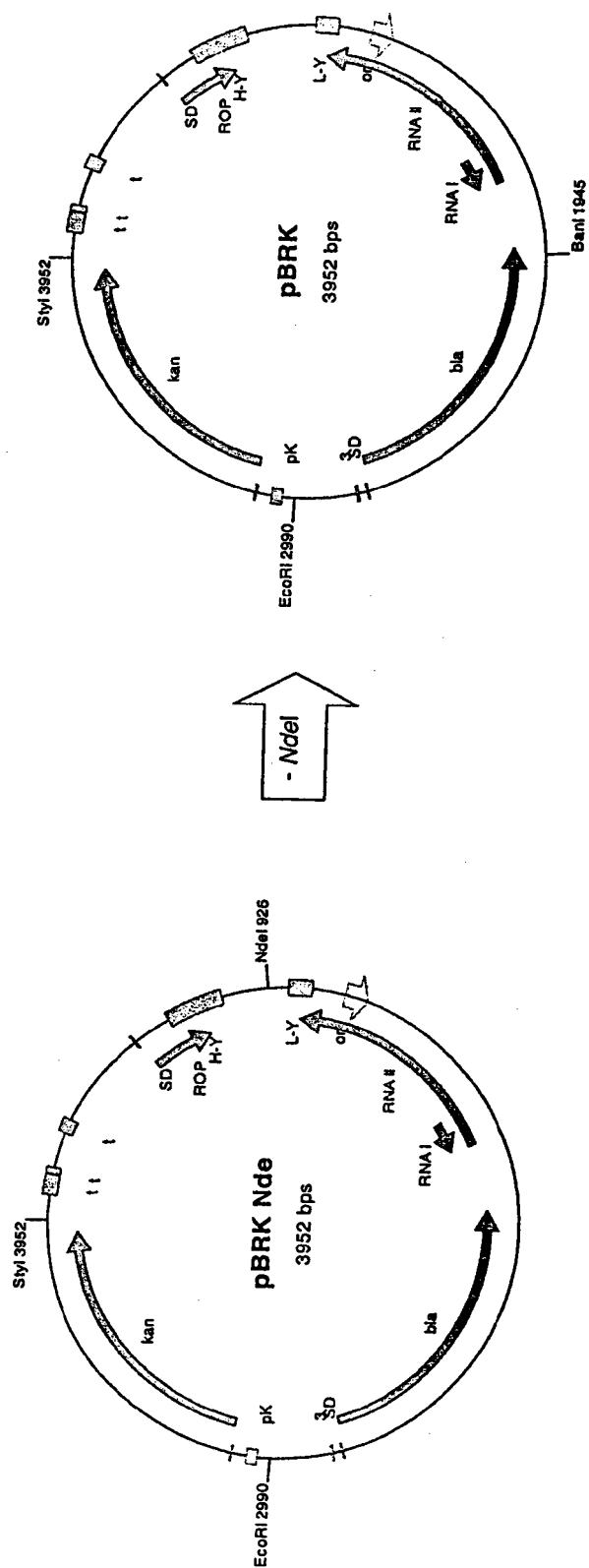
1/3

Handwritten signature



1. ábra

2/3



2. ábra

